

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biologie



Simona Moravcová

Význam apoptózy v mechanismu působení opioidů

Role of apoptosis in the mechanism of opioid effect

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6.5.2011

Podpis

1. Abstrakt

Opioidy jsou po mnoho let používány jako účinná analgetika. Největším problémem jsou však jejich nežádoucí účinky a možnost návyku. Jsou známy tři hlavní typy opioidních receptorů, které se liší především citlivostí k různým opioidům a rozmístěním v CNS. Tato práce se také zabývá apoptózou. Apoptóza je důležitý proces nejen v embryonálním vývoji například při správném vytvoření jednotlivých prstů, ale také v dospělosti například pro potlačení vzniku nádorů. Apoptotická cesta může být iniciována různým způsobem, ale mechanismus ukončení je pouze jeden. Je důležité, aby byla buněčná smrt a buněčné dělení v rovnováze. V případě porušení této rovnováhy dochází k patologickým stavům. Tato práce shrnuje účinky opioidů v souvislosti s apoptózou. V této souvislosti byl převážně zkoumán morfin, který působí jak proapoptoticky, tak antiapoptoticky. Dalšími používanými opioidy jsou metadon a heroin. Heroin je často sledován při studiích, ve kterých se zjišťuje, zda zneužívání tohoto silně návykového opioidu má vliv na apoptózu a správný vývoj v embryonálním vývoji.

Klíčová slova: opioidy, opioidní receptory, G-proteiny, apoptóza, morfin

2. Abstract

Opioids have been used as effective analgesics for many years. The worst problem is, however, their adverse effects and potential addiction. There are three known types of opioid receptors that differ mainly in their sensitivity to different opioids and their distribution in the CNS. This work also deals with apoptosis. Apoptosis is an important process not just in the embryonic development, e.g. for the right differentiation of fingers and toes, but also in the adulthood, e.g. to suppress tumour formation. Whereas an apoptotic pathway can be initiated in many different ways, there is only one mechanism that actually causes the death of a cell. It is important for the cell death and division to be in balance. The breach of this balance may result in pathologic effects. This work summarizes the effects of opioids in connection with apoptosis. The main object of the research of this relationship was morphine which has both pro-apoptotic and anti-apoptotic effects. Another two frequently investigated opioids are methadone and heroin. Heroin is mainly used in the studies researching the impact of this highly addictive opioid on the apoptosis and embryonic development.

Keywords: opioids, opioid receptors, G-proteins, apoptosis, morphine

3. Obsah	
1. Abstrakt1
2. Abstract2
3. Obsah3
4. Seznam zkratek5
5. Opioidy7
5.1 Historie7
5.2 Charakteristika7
5.3 Dělení7
6. Opioidní receptory8
6.1 μ opioidní receptor9
6.2 δ opioidní receptor9
6.3 κ opioidní receptor9
6.4 ORL opioidní receptor a další (σ , ϵ , ζ , λ)10
6.5 Agonisté opioidních receptorů10
6.6 Antagonisté opioidních receptorů11
7. Mechanismus působení opioidních receptorů11
7.1 Signalizace přes receptory spřažené s G-proteiny12
7.2 G_s , G_i , $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ a $G\beta\gamma$13
8. Apoptóza14
8.1 Objev, historie, původ slova14
8.2 Morfologické změny buňky15
8.3 Funkce: udržení rovnováhy, role ve vývoji16
9. Průběh apoptózy17
9.1 Vnitřní cesta (mitochondriální)17
9.2 Vnější cesta18
9.2.1 TNF18
9.2.2 Fas19
9.3 Na kaspázách závislá cesta20
9.4 Na kaspázách nezávislá cesta20
9.5 Závěrečná fáze21
10. Onemocnění související s apoptózou21
11. Molekuly zahrnuté v apoptóze21
11.1 Proapoptotické faktory (BH3-only proteiny)22

11.2 Antiapoptotické molekuly23
11.3 „Eat me or die“ molekuly23
12. Účinky opioidů v souvislosti s apoptózou23
12.1 Proapoptotické účinky opioidů24
12.2 Antiapoptotické účinky opioidů27
13. Závěr29
14. Literatura30
15. Internetové zdroje33

4. Seznam zkratk

AC	adenylylcykláza
AIF	apoptosis-inducing factor
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor
ATP	adenosintrifosfát
BH doména	Bcl-2 Homology domains
Btk	Brutonova tyrozínová kináza
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAD	caspase-activated DNase
CNS	centrální nervový systém
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DADLE	[D-Ala ² , D-Leu ⁵]-Enkefalín
DAG	diacylglycerol
DAMGO	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol ⁵]-Enkefalín
DEDs	death effector domains
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
DPDPE	[D-Pen ² , D-Pen ⁵]-Enkefalín
ER	endoplasmatické retikulum
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas ligand
GABA	kyselina γ -amino máselná
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GIT	gastrointestinální trakt
GPCRs	receptory spřažené s G-proteiny
IAPs	inhibitors of apoptosis proteins
ICAD	inhibitor CAD
ICD	intracelulární doména
IL	interleukin
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfát
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
LPA receptor	receptor lysofosfatidové kyseliny
MAPKs	mitogen activated protein kinases
NF- κ B	nuclear factor kappa-chain-enhancer of activated B cells
NGF	nerve growth factor
NMDARs	N-methyl-D-aspartic acid receptors
OR	opioidní receptor
ORL	opioid receptor-like receptors
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC- β	fosfolipáza C- β
PNS	periferní nervový systém
PS	fosfatidylserin
PSR	fosfatidylserinový receptor
PYK2	proteintyrozinkináza 2 beta (PTK2 β)
RIP	receptor-interacting protein
ROS	reactive oxygen species
SODD	silencer of death domains

TNF	tumor necrosis factor
TNF-R	TNF receptor
TRADD	TNF receptor-associated death domain
TRAF 2	TNF-R-associated factor 2

5. Opioidy

5.1 Historie

Je těžké určit, kdy a kde se mák setý začal pěstovat. Nejstarší známý doklad o užívání opia pochází z oblasti Mezopotámie, z doby téměř před 5000 lety, kdy staří Sumerové nazývali *Papaver somniferum* „rostlinou radosti“. Zbytky opia byly nalezeny v hrobkách Egypťanů pocházejících z 15. století př.n.l.. Přibližně ve stejné době se v Thébách pěstovalo opium nazývané „Thébské opium“, podle kterého byl pojmenován alkaloid Thebain. Již staří Řekové znali a využívali hypnotické vlastnosti opia. Také jsou záznamy užívání opia ve spojení s uctíváním božstva. I pro římskou civilizaci bylo opium významné. Známý římský lékař Galén byl nadšený z kladných vlastností opia, ale zároveň si uvědomoval rizika spojená s jeho užíváním. V 17. století byla napsána první kniha, která byla věnována převážně rizikům způsobeným nadměrným užíváním opia. Na počátku 19. století Fridrich Sertürner izoloval z opia morfin, který pojmenoval po řeckém bohu snů, Morfeu. Postupně byly v tomto století izolovány další alkaloidy jako kodein, thebain a papaverin. 20. století se odehrávalo ve znamení definování pojmů tolerance, psychická a fyzická závislost a v souvislosti s tím byl za látku způsobující největší závislost označen heroin. V roce 1973 byla potvrzena existence opioidních receptorů (Duarte 2005).

5.2 Charakteristika

Opioid je látka, která se váže na opioidní receptor a nachází se hlavně v CNS, PNS a GIT. Opioidy jsou nejznámější drogy ve světě; užití máku setého pro jeho terapeutický přínos předchází písemně doloženou historii. Analgetické účinky opioidů jsou důsledkem sníženého vnímání bolesti, snížené reakce na bolest stejně jako zvýšené tolerance k bolesti. Postranní účinky opioidů zahrnují utišení bolesti, útlum dýchání a zácpu. Opioidy mohou způsobit potlačení kašle a jsou známy pro svou schopnost vytvářet pocit euforie.

5.3 Dělení

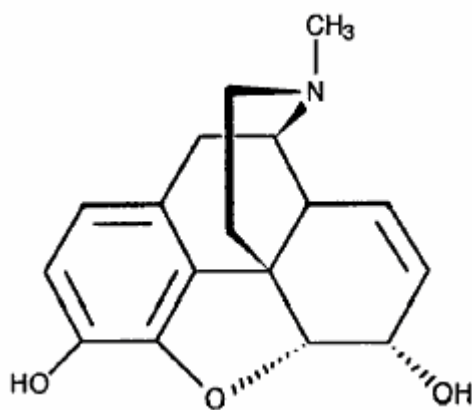
Opioidy se dělí do čtyř skupin podle původu^[1].

Přírodní opiáty jsou morfin (obr. 1), kodein a thebain. Za přírodní opiáty jsou také považovány opioidy v listech *Mitragyna speciosa*, které působí na μ a δ receptory. Salvinorin A, nalezen přirozeně v rostlině *Salvia divinorum*, je κ -opioidní receptorový agonista.

Polosyntetické opioidy jsou připraveny chemickou modifikací přírodních opiátů. Jsou to například hydromorfon, hydrokodon, oxycodon, oxymorfon, benzylmorfin či buprenorfin.

Mezi plně syntetické opioidy patří fentanyl, metadon a tramadol.

Čtvrtou skupinou jsou endogenní opioidní peptidy vytvářené přirozeně v těle - endorfiny, enkefaliny, dynorfiny a endomorfiny. β -endorfin působí na μ -opioidní receptory a vzniká z proopiomelanokortinu. Met-enkefalin je široce distribuován v CNS, je produktem proenkefalinových genů a působí přes μ a δ opioidní receptory. Leu-enkefalin je také produkt proenkefalinových genů a působí prostřednictvím δ -opioidních receptorů. Dynorfin působí na κ -opioidní receptory a je také široce distribuován v CNS. Endomorfin působí prostřednictvím μ -opioidních receptorů a je účinnější než jiné endogenní opioidy působící na tyto receptory. Jsou známy také drogy tramadol a tapentadol, které nepatří do žádné z opioidních skupin, ale agonisticky působí na μ -opioidní receptor. Jejich přesný mechanismus působení nebyl dosud zcela objasněn.



Obr. 1: Chemická struktura morfinu^[2]

6. Opioidní receptory

Opioidní receptory jsou primárním místem působení opiátů a endogenních opioidních peptidů, které mají širokou rozmanitost farmakologických a fyziologických účinků (Satoh 1995). Specifická vazebná místa v mozku pro opioidní látky byla poprvé popsána v roce 1973 (Dreborg 2008). Opioidní receptory jsou klasifikovány minimálně do třech hlavních skupin: μ , δ a κ , a jejich cDNA byla klonována. Rozdělení opioidních receptorů do skupin bylo navrženo na základě farmakologického působení různých opiátů a pojmenovány byly μ pro morfinovou skupinu, κ podle ketocyclazocinu a σ pro N-allylnormetazocin. Posledně jmenovaný byl však ze seznamu OR vyřazen, neboť bylo zjištěno, že odpovídá na jiné než opioidní látky. Kromě těchto typů receptorů byl nalezen vysokoafinní receptor pro enkefalin

v myším chámovodu, který byl pojmenován δ -receptor. Dále byl navržen ε -receptor jako vazebné místo pro β -endorfin v myším chámovodu (Sato 1995).

Všechny tyto receptory jsou členy velké rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs), které obsahují 7 transmembránových domén (Darlison 1997). Lidské μ , δ a κ -opioidní receptorové geny jsou umístěné na chromozomech 6q24-25, 1p34.3-36.1 a 8q11.2 (Sato 1995). μ , δ a κ_1 receptory jsou homologní navzájem, mají vysoce konzervované transmembránové části a intracelulární smyčky. Nejodlišnější úseky těchto receptorů jsou N a C terminální domény, 4. transmembránový úsek a 2. a 3. extracelulární smyčka (Mansour 1995).

Porovnáním sekvencí a umístěním na chromozomech bylo zjištěno, že μ a δ receptory jsou si navzájem příbuznější a κ a ORL1 receptory jsou si také navzájem bližší (Dreborg 2008). Analýza hydrofobicity z analyzovaných aminokyselinových sekvencí klonovaných opioidních receptorů ukázala, že tyto receptory mají 7 transmembránových helixů charakteristických pro GPCRs (Sato 1995). Všechny tři hlavní typy OR mají vysokou afinitu k opioidním alkaloidům (např. morfinu) a také relativně vysokou afinitu pro opioidního antagonistu naloxon (Connor 1999). Aktivace OR má za následek inhibici adenylcyklázy a regulaci propustnosti plazmatické membrány pro Ca^{2+} a K^+ ionty (Darlison 1997).

6.1 μ opioidní receptor

Klonovaný μ -OR má vysokou afinitu k morfinu, naloxonu a DADLE. μ -OR se dělí na μ_1 a μ_2 podtyp (Sato 1995). Darlison a kol. zjistili, že μ -OR byl vytvořen velmi brzy v průběhu evoluce, pravděpodobně před vznikem obratlovců, a že farmakologické a funkční vlastnosti tohoto receptoru jsou konzervované po více než 400 milionů let, což naznačuje, že plní významné fyziologické role (Darlison 1997).

6.2 δ opioidní receptor

Klonovaný δ -OR má vysokou afinitu k DADLE a k δ opioidnímu selektivnímu ligandu DPDPE, ale ne k μ -selektivnímu ligandu DAMGO nebo ke κ -selektivnímu ligandu U50,488H a U69,593 (Sato 1995).

6.3 κ opioidní receptor

κ -OR má vysokou afinitu pro dynorfin A, který je navržen jako endogenní κ -opioidní agonista, a pro κ -selektivní ligandy U50,488H a U69,593. κ -OR je také klasifikovaný do dvou

podtypů, κ_1 a κ_2 . Clark et al navrhli κ_3 vazebné místo, které má vysokou afinitu k naloxon benzoylhydrazonu, ale žádnou afinitu k U50,488H (Satoh 1995).

6.4 ORL opioidní receptor a další (σ , ε , ξ , λ)

Byl také izolován čtvrtý opioidní receptor, ORL1, který je geneticky blízce příbuzný k ostatním. ORL1 odpovídá na endogenního agonistu nociceptin (orphanin FQ). Má nízkou afinitu pro naloxon a další opioidní ligandy (Connor 1999).

σ receptory jsou heterogenní skupina receptorů s vysokou afinitou pro široké spektrum látek a s nízkou afinitou pro naloxon (Connor 1999). Tyto receptory se již za OR nepovažují.

Existence ε -OR je sporná. Tento receptor není obecně považován za člena OR, protože nebyl přesně charakterizován. Tento předpokládaný ε -opioidní receptor je stimulovaný supraspinálně β -endorfinem. β -endorfin vyvolá uvolnění Met-enkefalinu, který působí na δ_2 -opioidní receptor a způsobuje antinocicepci (Tseng 2001).

Zagon identifikoval receptor rozpoznávaný $[\text{Met}^5]$ -enkefalinem. Tento receptor nebyl podobný ostatním dosud popsaným opioidním receptorům. Zagon tak prokázal přítomnost nového opioidního receptoru a pojmenoval ho zeta (Zagon 1989). OGF (opioid growth factor), $[\text{Met}^5]$ -enkefalin, interaguje se ξ -OR a reguluje růst nervového systému. Bylo zjištěno, že ξ -OR má čtyři vazebné podjednotky o molekulových hmotnostech 32, 30, 17 a 16 kDa (Zagon 1993).

In vitro studie ukázaly existenci rozmanitých typů opioidních receptorů. Další místo v mozku u potkana označené jako λ vazebné místo je odlišné od ostatních typů citlivostí k 4,5-epoxymorfinanům (naloxonu a morfinu). Zatímco λ vazebné místo vykazuje vysokou afinitu pro naloxon *in vivo*, *in vitro* se rychle mění na stav s nízkou afinitou. Distribuce λ míst v mozku je nápadně odlišná od distribuce klasických opioidních receptorů (Grevel a Sadée 1983).

6.5 Agonisté opioidních receptorů

Agonista je látka, která se váže na receptor a jeho aktivací spouští buněčnou odpověď. Agonista často mimikuje působení látek, pro které byl primárně daný receptor vytvořen^[3].

Afinita OR pro opioidní agonisty je snížena sodnými ionty, zatímco pro antagonisty je spíše zvýšená (Satoh 1995). Analgetické působení opiátů, jako je morfin a opioidní peptidy, je připisováno jejich schopnosti inhibovat uvolnění neurotransmiterů z primárních aferentních zakončení v zadním rohu míšním (Satoh 1995).

6.6 Antagonisté opioidních receptorů

Antagonista je receptorový ligand nebo látka, která nevyvolává biologickou odpověď po navázání na receptor, ale blokuje nebo tlumí odpověď zprostředkovanou agonistou. Většina antagonistů dosáhne své účinnosti kompetováním o navázání na receptor s endogenními ligandy nebo látkami, které strukturně odpovídají vazebnému místu na receptoru. Antagonisté mohou působit reverzibilně či ireverzibilně. Mnoho antagonistů je reverzibilních a stejně jako agonisté se váží a vyvazují z receptoru díky nekovalentní vazbě a konformaci receptoru a ligandu. Ireverzibilní antagonisté se kovalentně váží na cílový receptor a obvykle nemohou být odstraněni; takto inaktivovaný receptor může být nahrazen syntézou nových receptorů^[4].

Naloxon je opioidní antagonist s vysokou afinitou pro μ -, mírnou pro κ - a relativně nízkou afinitou pro δ -OR. Na N-konci zkrácený μ -OR váže naloxon s podobnou afinitou, jako nezkrácený, což naznačuje, že N-koncová doména μ -OR není esenciální pro vazbu naloxonu. Bylo ale zjištěno, že N-konec κ -OR je významný z hlediska vazby naloxonu (Sato 1995).

Příklady běžných agonistů a antagonistů OR jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Agonisté a antagonisté opioidních receptorů

	μ -OR	κ -OR	δ -OR
agonista	morfin	dynorfin A	DADLE
	metadon	Salvinorin	DPDPE
	DAMGO	DPDPE	buprenorfin
	DADLE	oxykodon	
	fentanyl		
	buprenorfin		
	hydromorfon		
antagonista	naloxon	naloxon	naloxon
	naltrexon	buprenorfin	naltrindol

7. Mechanismus přenosu informace prostřednictvím opioidních receptorů

Proteiny vázající guaninové nukleotidy (G-proteiny) jsou molekuly, které přenášejí signály od mnoha receptorů pro hormony (např. glukagon, luteinizační hormon a adrenalin), neurotransmitery (acetylcholin, dopamin a serotonin), chemokiny (IL-8) a autokrinní a parakrinní faktory. Extracelulární signály jsou přijaty členy velké rodiny receptorů se

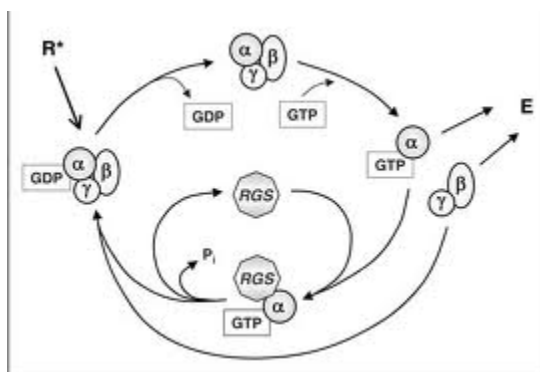
sedmkrát přes membránu procházejícími úseky, které aktivují příslušné G-proteiny a ty směřují signály do dalších rozdílných signalizačních drah. Tyto dráhy mohou mezi sebou interagovat a vytvářet sítě, které regulují metabolické enzymy, iontové kanály, transportery a další součásti mechanismu, který kontroluje široké spektrum buněčných procesů zahrnujících transkripci, pohyb, kontrakci a sekreci. Různé buněčné procesy postupně regulují systémové funkce, jako jsou embryonální vývoj, vývoj gonád, učení a paměť a homeostázu organismů (Neves 2002).

7.1 Signalizace přes receptory spřažené s G-proteiny

Heterotrimerní G-proteiny jsou regulační molekuly lokalizované v plasmatické membráně pod buněčným povrchem, které propojují receptory s efekty a přenášejí signál do nitra buňky. Poté, co byly identifikovány první čtyři G-proteiny (G_s , G_t , G_i a G_o) pomocí biochemické purifikace, velké množství dalších G-proteinů a jejich podjednotek bylo identifikováno klonováním cDNA (Neves 2002).

G-proteiny se skládají ze třech podjednotek: α , β a γ . Při signalizaci fungují v podstatě jako dimery, protože signál je přenášen buď $G\alpha$ podjednotkou nebo $G\beta\gamma$ komplexem.

Dnes je známo 20 $G\alpha$, 6 $G\beta$ a 11 $G\gamma$ podjednotek. Na základě sekvenční podobnosti jejich α podjednotek byly rozděleny do čtyř rodin (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$) a tato klasifikace také napomáhá k určení propojení receptoru s efektem. Extracelulární signály jsou směřovány na specifické G-proteiny prostřednictvím různých typů receptorů. Například signál adrenalinu je přenášen prostřednictvím β_1 -adrenergního receptoru spřaženého s G_s , α_2 -adrenergního receptoru spřaženého s G_i a α_1 -adrenergního receptoru spřaženého s G_q a G_{11} . G-proteiny takto regulují důležité buněčné komponenty, jako jsou metabolické enzymy, iontové kanály, ale mohou také ovlivňovat proces transkripce (Neves 2002).



Obr. 2: Aktivace G-proteinů^[5]

Je možných mnoho kombinací $\alpha\beta\gamma$ s unikátními funkčními vlastnostmi. Agonista se naváže na receptor a spustí sérii událostí zahrnující uvolnění GDP z α podjednotky, která je v klidovém stavu v komplexu s $\beta\gamma$, vazbu GTP na α podjednotku a její aktivaci, disociaci G-proteinu z receptoru, oddělení α -GTP od $\beta\gamma$ a následnou regulaci efektorů prostřednictvím α nebo $\beta\gamma$ komplexu (obr. 2) (Standifer a Pasternak 1997).

7.2 G_s , G_i , $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ a $G\beta\gamma$

G_s signalizace

Buněčná signální dráha řízená G_s má důležitou roli v řízení různých buněčných procesů a mnoho klíčových konceptů zahrnujících druhé posly, proteinovou fosforylaci a signální přenašeče pochází z výzkumu této dráhy. G_s je regulační protein, který klasicky stimuluje enzymovou aktivitu adenylylcyklázy. Dokonce i po 40 letech studia se však objevují nové detaily pro G_s dráhu. Poměrně nedávné objevy zahrnují identifikaci GEF pro malou guanosinovou trifosfatázu (GTPáza) Rap, která je přímo aktivovaná druhým poslem cAMP. Toto naznačuje mechanismus, kterým G-proteiny regulují aktivity malých GTPáz. Aktivace Rap spojuje G_s signalizaci s MAPK kaskádou (Neves 2002).

G_i signalizace

Tato cesta byla původně identifikována schopností $G\alpha_i$ inhibovat adenylylcyklázu. Mnoho důležitých hormonů a neurotransmiterů (zahrnující adrenalin, acetylcholin, dopamin a serotonin) používá G_i a G_o cestu k vyvolání fyziologických odpovědí. Signál přenášený touto dráhou je inhibován pertusis toxinem (Neves 2002).

$G_{q/11}$ signalizace

Tato dráha je aktivována kalcium-mobilizujícími hormony a stimuluje PLC- β k produkci intracelulárních poslů IP_3 a DAG. IP_3 spouští uvolnění kalcia z intracelulárních zásobáren a DAG aktivuje PKC. V mnoha buněčných typech se uvolněním intracelulárního vápníku aktivují K^+ kanály na buněčném povrchu a umožní vtok extracelulárního kalcia. Zdá se, že $G_{q/11}$ také reguluje různé izoformy fosfolipázy D. $G\alpha_{q/11}$ také aktivuje transkripční faktor NF- κ B prostřednictvím PYK2 (Neves 2002).

G_{12} a G_{13} signalizace

$G\alpha_{12}$ přímo interaguje s GTPasu aktivujícími proteiny Ras, RasGAP a Btk. $G\alpha_{12}$ stimuluje fosfolipázu D, c-Src a PKC dosud neidentifikovaným mechanismem. Mezi

receptory interagující s $G\alpha_{13}$ patří LPA receptor a tromboxan A2 receptor. $G\alpha_{13}$ přímo aktivuje RhoGEF, což vede k regulaci Na^+-H^+ transportéru (Kurose 2003).

$G\beta\gamma$

Nejen $G\alpha$, ale také $G\beta\gamma$ podjednotka může přenášet signály. $G\beta\gamma$ přímo reguluje nejméně čtyři efektorové molekuly a nepřímo malou GTPázu Ras a aktivuje MAPKs. Efektory přímo regulované prostřednictvím $G\beta\gamma$ jsou PLC- β , K^+ kanály, adenylcykláza a PI3K (Neves 2002).

8. Apoptóza

8.1 Objev, historie, původ slova

Německý přírodovědec Carl Vogt byl první, kdo v roce 1842 popsal princip apoptózy. V roce 1885 anatom Walther Flemming dodal přesnější popis průběhu programované buněčné smrti. Až do 20. století se pak o apoptóze nemluvalo a v roce 1965 bylo toto téma znovu vzkříšeno.

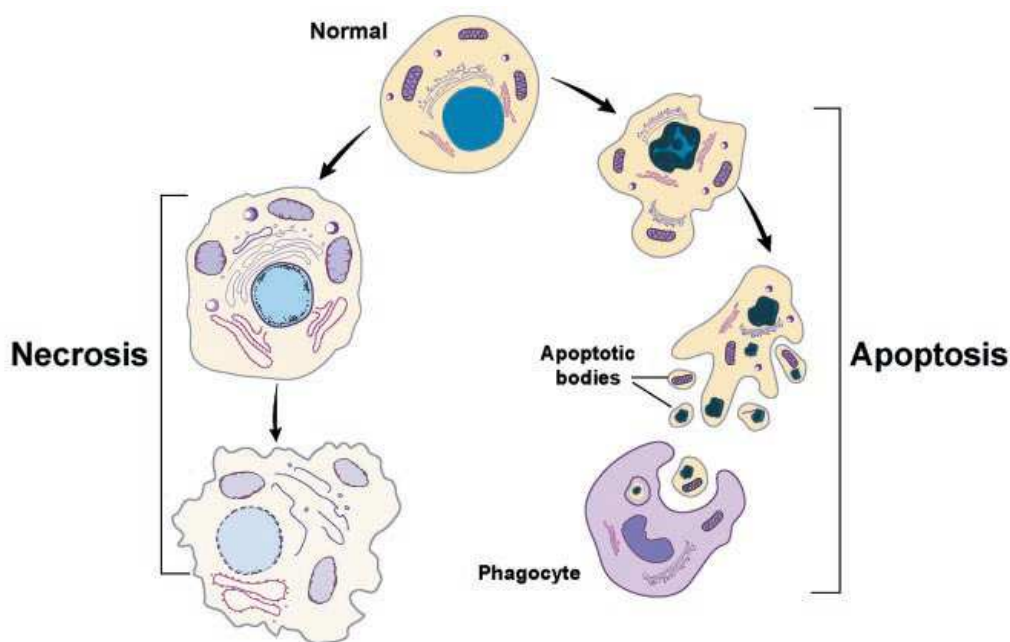
Kerr v roce 1972 navrhl termín „apoptóza“, starověké řecké slovo používané k popisu opadávání listů ze stromů nebo okvětních lístků z květin, poukazující na částečnou morfologii fyziologické buněčné smrti. Termín „apoptóza“ je často používán jako synonymum programované buněčné smrti, novější praktičtější definice však naznačuje, že smrt je výsledkem řízené aktivace předem připraveného programu, který je zakódován v genomu. Odsouzená buňka často s pomocí sousedních buněk a humorálních faktorů následuje program smrti (Saikumar 1999).

Vaux a kol. popsali antiapoptotickou a tumorogenní úlohu lidského nádorového genu Bcl-2 (Vaux 1988). Ale ačkoli gen Bcl-2 byl jakožto první součást mechanismu buněčné smrti nalezen v různých organismech, identifikace dalších součástí tohoto mechanismu u obratlovců musela čekat na spojení apoptózy s mechanismem programované buněčné smrti u hlístů. V roce 1991 byly objeveny geny u *Caenorhabditis elegans*, které kódují proteiny indukující apoptózu: ced-3 a ced-4 a také byl identifikován gen s opačnou činností: ced-9. Produkt tohoto genu, který se podobá Bcl-2, ochraňuje buňky před programovanou buněčnou smrtí (Raff 1992). Rok 1993 byl důležitý z hlediska objevení interleukin-1- β -konvertujícího enzymu jako savčího homologu k CED-3 enzymu (Yuan 1993). V roce 1994 bylo publikováno, že ced-9 má podobnou sekvenci jako Bcl-2 (Hengartner 1994). V roce 1997 byl identifikován protein podobný CED-4 a byl pojmenován Apaf-1 (Zou 1997).

8.2 Morfologické změny buňky

Obecně se mluví o dvou typech buněčné smrti: apoptóze a nekróze (obr. 3). Nekróza je považována za náhodný typ smrti, způsobený celkovým poškozením buňky a má za následek smrt skupiny buněk v tkáni. Naproti tomu apoptotická buněčná smrt může být indukovaná nebo předem naprogramovaná v buňce a má za následek smrt jednotlivých buněk (Zimmermann 2001).

Forma buněčné smrti nazvaná nekróza může nastat v odpovědi na poškození jedy, na fyzické podněty nebo ischemii. Nabobtnání buněk a rozpad membrán jsou významné rysy nekrózy. V tomto způsobu buněčné smrti jaderný chromatin podstoupí lýzi, ne kondenzaci. Protože jsou poškozené velké skupiny buněk a buněčný obsah je brzy ztracen v extracelulárním prostoru, nekrotické tkáně způsobují silnou zánětlivou odpověď. Naproti tomu u apoptózy nastane membránové poškození později a mrtvé buňky jsou pohlceny sousedními buňkami nebo fagocyty, což vede buď k malému zánětu, nebo se zánět nemusí objevit vůbec. Na rozdíl od apoptózy, nekróza nevyžaduje energii pro svůj vznik a podněty, které indukují apoptózu v přítomnosti energie, vedou k nekróze v nepřítomnosti energie v důsledku prudkého poklesu ATP. Tedy, buňky poškozené stresovými podněty mohou zahájit apoptotické programy, ale podlehnout nekróze mohou sekundárně, když úroveň energie uvnitř buněk poklesne (Saikumar 1999).



Obr. 3: Srovnání nekrózy a apoptózy (Saikumar 1999)

Apoptotické buňky mohou být charakterizovány specifickými morfologickými a biochemickými změnami řízenými rodinou cysteinových proteáz známých jako kaspázy (Zimmermann 2001).

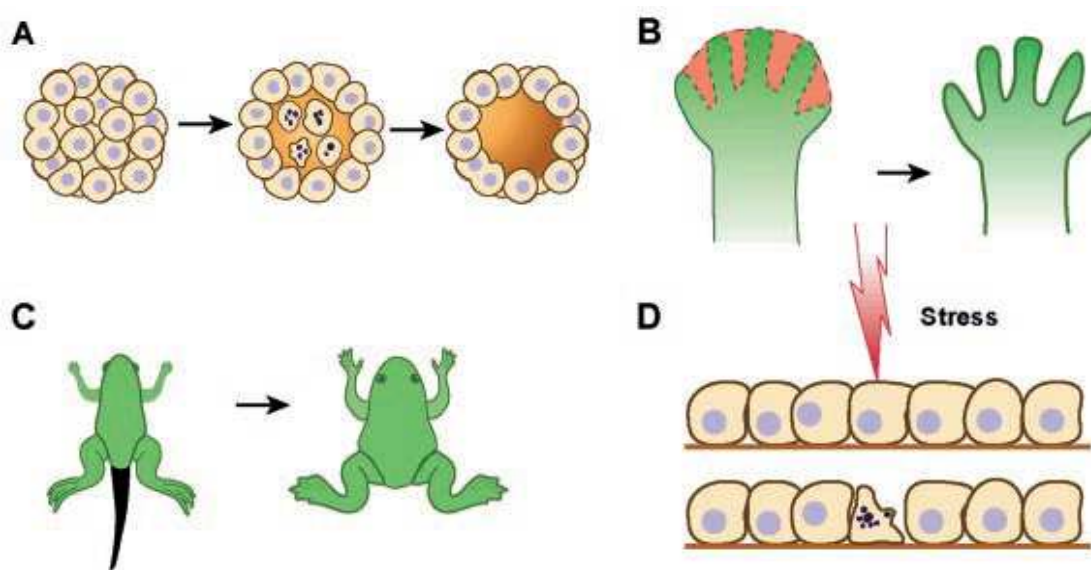
Elektronová mikroskopie ukazuje, že strukturní změny během apoptózy probíhají ve dvou samostatných fázích: první zahrnuje utváření apoptotických tělísek, druhá jejich fagocytózu a degradaci jinými buňkami (Kerr 1972). Apoptóza se vztahuje k morfologickým rysům programované buněčné smrti, která je charakterizována buněčným smrštěním, jadernou kondenzací, membránovým pučením, štěpením apoptotických tělísek z membrány a membránovými změnami, které nakonec vedou k fagocytóze zasažených buněk (Saikumar 1999). Ve všech tkáních až dosud studovaných byla většina apoptotických tělísek nalezena uvnitř cytoplasmy neporušených buněk. To naznačuje, že jsou rychle fagocytovány, možná kvůli změnám ve vlastnostech jejich povrchových membrán (Kerr 1972).

8.3 Funkce: udržení rovnováhy, role ve vývoji

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je esenciální fyziologický proces nutný pro normální vývoj a udržování tkáňové homeostázy. Apoptóza je ale také spojena s širokým rejstříkem patologických situací, zahrnujících akutní neurologické poškození, neurodegenerativní onemocnění, kardiovaskulární choroby, imunologická onemocnění, syndrom získané imunodeficiencie a nádory (Zimmermann 2001). Bylo zjištěno, že apoptóza hraje významnou roli v některých typech atrofie a odumírání. Velikost buněčné populace závisí na rovnováze mezi buněčnou produkcí a buněčnými ztrátami. Je zajímavé, že hormony, které způsobují proliferaci a diferenciaci buněk v některých situacích, mohou způsobit apoptózu za jiných okolností: například thyroideální hormon stimuluje při vývoji obojživelníků jak růst těla, tak rozšířenou buněčnou smrt v žábách a ocase (Kerr 1972).

Nehledě na její roli v normální ontogenezi, apoptóza je také důležitá v teratogenezi. Mnoho teratogenních faktorů produkuje apoptózu v místě jejich působení (Kerr 1972). Během vývoje buněčná smrt pomáhá modelovat části těla, například utváření dutin a oddělování prstů (obr. 4). Také odstraňuje rudimentární, zakrnělé struktury, které jednou plnily funkci během embryogeneze. Programovaná buněčná smrt hraje komplementární, ale opačnou úlohu k buněčnému dělení jako homeostatický mechanismus v regulaci živočišné buněčné populace. Buněčné programy smrti jsou požadované pro vývoj živočichů, ale také pokračují v dospělosti. U dospělých živočichů buněčná smrt vyvažuje buněčné dělení udržující stálost tkáňové hmoty. Odstranění buněk poškozených genetickými defekty, stárnutím, chorobami nebo expozicí škodlivým činidlům je možné prostřednictvím apoptózy.

Navíc, normální imunitní odpověď požaduje řízenou eliminaci specifických buněčných souborů touto metodou buněčné smrti. Během vývoje obratlovců je produkováno více nervových buněk, než je potřeba a tak je běžné, že 20-80 % neuronů spáchá „sebevraždu“. V tomto případě, neurony plodu soutěží o omezené množství NGF (nerve growth factor), což je důležitý faktor pro přežití produkovaný jinými buňkami, včetně neuronů. Jen některé buňky dostanou dostatek NGF pro přežití. Zbytek podstoupí apoptózu (Jacobson 1997). Apoptóza je také obvyklá v dalších důležitých procesech jako je uvolňování sliznice během menstruace, smrt neutrofilů během akutní zánětlivé odpovědi a delece autoreaktivních T buněk v thymu (Saikumar 1999).



Obr. 4: Příklady apoptózy (Saikumar 1999)

9. Průběh apoptózy

9.1 Vnitřní cesta (mitochondriální)

Mitochondrie hrají nezbytnou roli v apoptóze uvolněním apoptogenních faktorů, jako je cytochrom c, z intermembránového prostoru do cytoplasmy, což aktivuje závěrečnou fázi apoptózy. V žijících buňkách jsou mitochondriální změny převážně předcházeny proteiny Bcl-2 rodiny. Zatímco antiapoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-XL předchází uvolnění cytochromu c z mitochondrií a tím zajišťují přežití buňky, proapoptotické proteiny hrají hlavní úlohu při uvolnění cytochromu c (Zimmermann 2001). Cytochrom c je kódován

jaderným genem, ale když je importován do mitochondrií, je spřažený s hemovou skupinou a stane se z něj holocytochrom c a jen tato forma může aktivovat kaspázy (Yang 1997).

Uvolnění cytochromu c je spuštěno Bax molekulami, které oligomerizují a formují póry ve vnější membráně mitochondrií (Ndozangue-Touriguine 2008). Buňky uvolní cytochrom c, udělají to náhle a najednou a zřejmě ze všech mitochondrií v buňce (Goldstein 2005). Po uvolnění cytochromu c jsou aktivovány kaspázy a buňka podstoupí apoptózu. Formuje se apoptosóm (skládající se z cytochromu c, Apaf-1 a prokaspázy 9) a ten je závislý na cytochromu c uvolněném z mitochondrií a na ATP nebo dATP v buňce (Zimmermann 2001).

Kaspázy mají aspartátovou specifitu a musí být štěpeny dvakrát na zbytcích kyseliny asparagové, aby se z nich staly aktivní enzymy. První štěpení oddělí velké a malé podjednotky zatímco druhé štěpení uvolňuje N-terminální prodoménu (Ndozangue-Touriguine 2008). Aktivní kaspáza je tetramer 2 velkých a 2 malých podjednotek se dvěma aktivními místy (Zimmermann 2001). Kaspázy zahrnuté v apoptóze se dělí do dvou skupin: iniciátorové kaspázy, například kaspáza 8, 10 a 9 (možná i 2) a efektorové kaspázy jako jsou kaspáza 3, 7 a 6. Kaspáza 9 se sama štěpí a aktivuje v apoptosómu a poté aktivuje prokaspázu-3 (Ndozangue-Touriguine 2008). Některé kaspázy jsou konstitutivně exprimovány v buňkách a zůstávají v cytosolu v inaktivní formě. Nejčastější kaspáza v buňce je kaspáza-3 (Zimmermann 2001).

Buňka také obsahuje přirozené inhibitory kaspáz. Tyto inhibitory IAPs byly poprvé nalezeny v baciloviru, ale následně byly zjištěny i v lidských buňkách (XIAP, c-IAP1, c-IAP2). IAPs mohou působit jako přímé inhibitory dvou efektorových kaspáz (kaspázy-3 a 7) a jsou také schopné potlačit aktivaci iniciačních kaspáz jako jsou kaspáza-8 a kaspáza-9 (Zimmermann 2001).

9.2 Vnější cesta

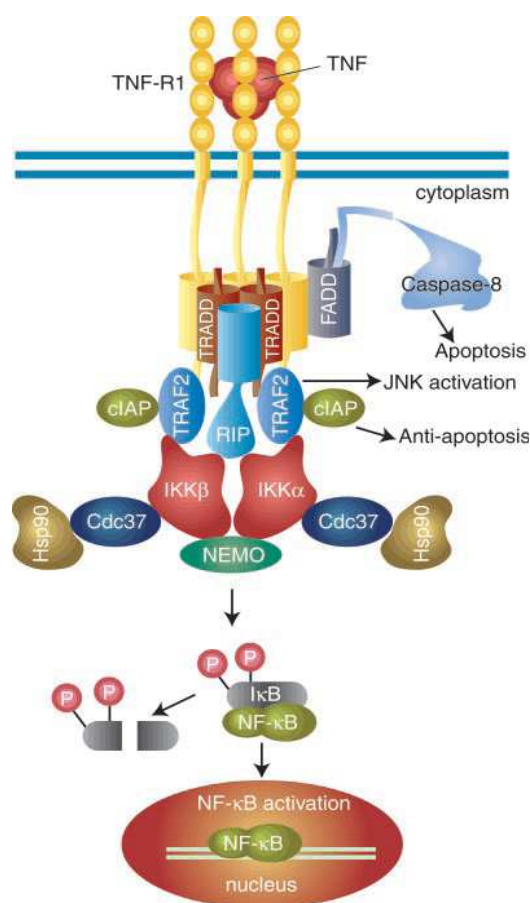
Vnější cesta aktivace apoptózy začíná na cytoplasmatické membráně a je zprostředkována „receptory smrti“ (TNF-R, Fas).

9.2.1 TNF

Tato signální dráha, na jejímž konci je apoptóza, je spuštěna interakcí TNF s TNF-R1 (obr. 5).

TNF je homotrimer ze 157 AK a je produkován zejména aktivovanými makrofágy. Lze rozlišit dva povrchové receptory: TNF-R1 a TNF-R2. Vazba TNF na TNF-R1 spustí sérii intracelulárních událostí, které mají za následek aktivaci dvou hlavních transkripčních faktorů

– NF- κ B a c-Jun. Tyto transkripční faktory jsou zodpovědné za navození exprese genů důležitých pro rozmanité biologické procesy zahrnující buněčný růst a smrt, vývoj, onkogenezi, imunitu, zánět a stresové odpovědi. Prvním krokem je navázání TNF trimerního na extracelulární doménu TNF-R1 a uvolnění inhibiční domény SODD z intracelulární domény TNF-R1 (ICD). Takto sestavený komplex je rozeznán adaptorovými proteiny (TRADD), RIP, TRAF2 a FADD. Tyto adaptorové proteiny postupně doplní další klíčové enzymy k TNF-R1 komplexu a následuje aktivace NF- κ B a JNK vedoucí k apoptóze (Chen a Goeddel 2002).

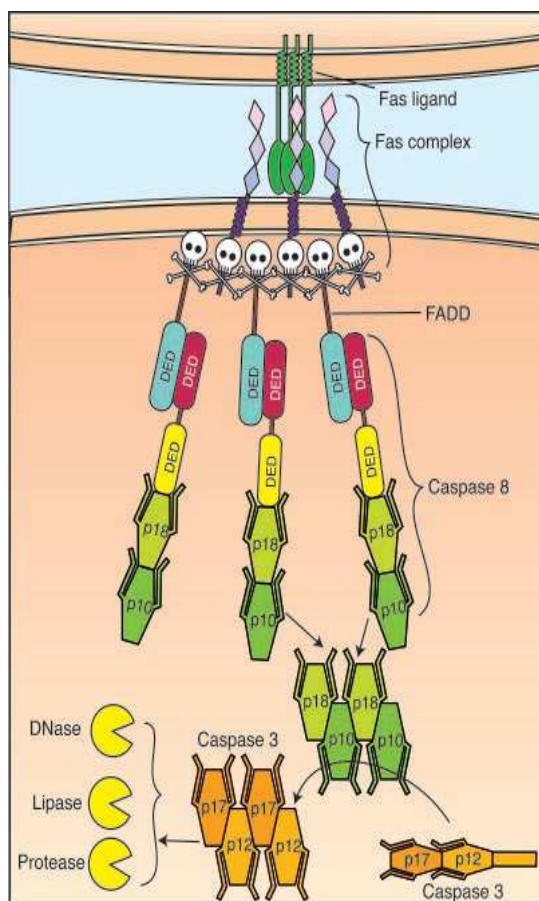


Obr. 5: Dráha vedoucí k apoptóze pomocí TNF receptoru (Chen a Goeddel 2002)

9.2.2 Fas

Fas ligand je 40 kDa transmembránový protein, který spouští apoptózu navázáním na Fas receptor. Fas receptor (APO-1, CD 95) je glykosylovaný 45 kDa transmembránový receptor, který patří k receptorové rodině TNF/nerve growth factor. Ačkoli se zpočátku zdálo, že FasL je specifický pro lymfoidní tkáň, ukázalo se, že je konstitutivně exprimován i v různých nelymfoidních tkáních (například srdce a pankreas). Podobně i exprese Fas není

omezena jen na lymfoidní tkáň. Fas–FasL interakce hraje významnou roli při selekci autoreaktivních T lymfocytů. Po navázání ligandu na receptor se utvoří homotrimerní komplex. Dojde k navázání adaptorových proteinů FADD. FADD má specifické sekvence nazývané DEDs, které interagují s DEDs na apoptotickém enzymu (například na kaspáze-8), a to má za následek iniciaci apoptotické kaskády (obr. 6) (Saikumar 1999).



Obr. 6: Fas-L indukovaná apoptóza (Wajant 2002)

9.3 Na kaspázách závislá cesta

Tato cesta zahrnuje Apaf-1 a kaspázy, stejně jako CAD a ICAD a vede k DNA fragmentaci a napomáhá kondenzaci chromatinu. Ale kaspázy a CAD nejsou jediné efektory, které způsobují jadernou apoptózu (Susin 2000).

9.4 Na kaspázách nezávislá cesta

Druhý na kaspázách nezávislý způsob zahrnuje AIF a vede k rozsáhlé fragmentaci DNA a periferní kondenzaci chromatinu. AIF je mitochondriální intermembránový flavoprotein,

který se translokuje z mitochondrií do jádra nezávisle na kaspázách (Susin 2000). AIF je faktor, který způsobuje uvolnění cytochromu c (Susin 1999).

AIF a CAD způsobují dva morfologicky a biochemicky odlišné typy jaderné apoptózy (Susin 2000).

9.5 Závěrečná fáze

Je mnoho způsobů iniciace apoptózy, ale konečné provedení se děje jen jedním mechanismem. Tato fáze je specifická vznikem apoptotických tělísek. Tvorba apoptotických tělísek zahrnuje výraznou kondenzaci jádra a cytoplasmy, jadernou fragmentaci a oddělení výběžků, které se formují na buněčném povrchu a vytváří mnoho kompaktních tělísek různých velikostí. Buňky, které podstupují apoptózu jsou kondenzované a oddělené od sousedních a jaderný chromatin je seskupen v hustou masu. Obsah apoptotických tělísek závisí na prvcích, které jsou přítomny v cytoplasmatických výběžcích, které jim dávají vznik. Apoptotická tělíska byla nalezena v cytoplasmě neporušených buněk, což naznačuje, že jsou rychle fagocytovány, pravděpodobně kvůli změnám vlastností jejich povrchových membrán (Kerr 1972).

10. Onemocnění související s apoptózou

V normálním stavu jsou proliferace a buněčná smrt v rovnováze. Změny v poměru buněčné smrti a proliferace jsou spojené s patogenezí. Například neúspěch vyřazení autoreaktivních T buněk apoptózou a výsledná destrukce beta buněk v Langerhansových ostrůvcích v pankreatu hrají hlavní roli v patogenezi diabetes mellitus (Saikumar 1999). Inhibice a stimulace apoptózy hraje také významnou roli při přijetí či odmítnutí štěpu a při různých imunitních onemocněních. Mutace a delece apoptotických genů hraje důležité role v karcinogenezi, růstu nádorů a nádorové regresi. p53 protein je transkripční faktor, který má rozmanité role v regulaci buňky. Některé viry se ochraňují před apoptózou v hostitelské buňce expresí kaspázových inhibitorů, produkcí proteinů, které inhibují Fas a TNF zprostředkovanou apoptózu (Saikumar 1999).

11. Molekuly zahrnuté v apoptóze

Proteiny Bcl-2 rodiny jsou rozhodující regulátory apoptózy. Mezi členy rodiny Bcl-2 patří BH3-only proteiny, které byly rozpoznány jako esenciální iniciátory programované buněčné smrti a stresem indukované apoptózy (Bouillet a Strasser 2002).

Od doby objevení Bcl-2 proteinu bylo v savčích buňkách identifikováno přinejmenším 19 členů Bcl-2 rodiny, které vlastní alespoň 1 ze 4 konzervovaných sekvencí známých jako Bcl-2 homologní domény (BH1 až BH4). Bcl-2 proteiny můžou být rozděleny do třech kategorií podle jejich funkce a struktury:

- a) antiapoptotické proteiny – Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 a A1 (Bfl-1)
- b) proapoptotické molekuly – Bax, Bak a Bok (Mtd)
- c) BH3-only proteiny – Bid, Bad, Bim

BH3-only proteiny se tak nazývají, protože ze 4 Bcl-2 homologních úseků obsahují pouze ten třetí. Studia buněčné lokalizace ukazují, že Bcl-2 a Bcl-x_L jsou umístěny ve vnitřní membráně mitochondrií, zatímco proapoptotické proteiny mohou být buď cytosolické nebo přítomné v mitochondriální membráně (Zimmermann 2001).

Ačkoliv se proapoptotické faktory Bcl-2 rodiny nacházejí i jinde (ER, jaderný obal), hlavní účinek se zdá být v mitochondriích. Tyto orgány pak uvolní proteiny obsažené v intermembránovém prostoru, včetně cytochromu c (Zimmermann 2001).

11.1 Proapoptotické faktory (BH3-only proteiny)

Proapoptotické molekuly z rodiny Bcl-2 iniciují buněčnou smrt formováním pórů ve vnější membráně mitochondrií, což způsobuje uvolnění cytochromu c do cytosolu. Nejlépe prostudovaní proapoptotičtí členové rodiny Bcl-2 proteinů jsou Bax a Bid. Bax, normálně cytosolický protein, translokuje do mitochondrií v důsledku působení různých apoptotických podnětů nebo stresu. Bax ve vnější membráně zaujme aktivní konformaci a tvoří póry a tím uvolňuje cytochrom c z intermembránového prostoru. Na rozdíl od Bax, Bid vyžaduje proteolýzu pomocí kaspázy-8 pro jeho proapoptotickou funkci. Zkrácený Bid (15 kDa) translokuje z cytosolu do mitochondrií a uvolňuje cytochrom c selektivní propustností vnější membrány, pravděpodobně interakcí s Bax (Saikumar 1999).

Bylo zjištěno, že BH3-only proteiny požadují přítomnost Bax/Bak-like proteinů pro jejich schopnost zabít buňku a také Bax/Bak-like proteiny požadují pro buněčné zabíjení signál od BH3-only proteinů (Bouillet a Strasser 2002).

Ve zdravých buňkách se Bax nachází jako monomer v cytoplasmě nebo volně připojen na vnější mitochondriální membránu, zatímco Bak se zdá být připojen k mitochondriím. V odpovědi na apoptotický podnět změní Bax konformaci a translokuje z cytoplasmy do mitochondrie, kde podstoupí oligomerizaci. Savci mají nejméně 8 BH3-only proteinů a zdá se, že se vyvinuly jako odpověď na odlišné stresové podněty (Bouillet a Strasser 2002).

11.2 Antiapoptotické molekuly

Nejprostudovanější antiapoptotické molekuly Bcl-2 rodiny jsou Bcl-2 a Bcl-x_L, zatím nejmocnější inhibitory buněčné smrti. Zabraňují mitochondriální permeabilizaci a uvolnění cytochromu c. Bylo také dokázáno, že Bcl-2 má důležité stabilizační účinky nejen ve vnější mitochondriální membráně, ale také v ER a jaderném obale (Saikumar 1999).

Bcl-2 byl poprvé objeven jako protoonkogen ve folikulárních B-buňkách lymfomu. Postupně byl identifikován jako savčí homolog k apoptotickému represoru ced-9 u *Caenorhabditis elegans* (Zimmermann 2001).

V některých buněčných typech, jako např. v epiteliálních buňkách ledvin, melanocytech, lymfocytech a myeloidních buňkách, Bcl-2 funguje jako klíčový ochránce přežití buňky a v jeho nepřítomnosti Bim přinutí tyto buňky zemřít (Bouillet a Strasser 2002).

11.3 „Eat me or die“ molekuly

Fagocyty rozpoznávají „eat me“ signály jako například PS rozložený na povrchu umírajících buněk. Makrofágy mají PSR, který rozpoznává PS a je zodpovědný za pohlcení umírajících buněk (Savill, Gregory a Haslett 2003).

12. Účinky opioidů v souvislosti s apoptózou

Silné analgetické účinky opioidů jsou způsobeny signalizací opioidními receptory v neuronech. Různé studie ukazují, že vedle těchto dobře prozkoumaných účinků opioidy vyvolávají rozmanité biologické účinky, které se zdají být nezávislé na analgetických vlastnostech a mohou ovlivňovat přežití buněk a proliferaci (Tegeder a Geisslinger 2004).

Účinky, které podporují smrt buněk, byly připsané inhibici NF-κB, zvýšené expresi Fas, stabilizaci p53, uvolnění cytokinů a chemokinů a aktivaci NO syntázy, p38 a c-Jun-N-terminální kinázy (Tegeder a Geisslinger 2004).

Srovnání vysoké a nízké dávky morfinu *in vitro* odhaluje dvojí na koncentraci závislé účinky, tzn. mitogenezi za nízkých a inhibici růstu a apoptózu za vysokých koncentrací (Tegeder a Geisslinger 2004).

Signalizace opioidními receptory byla zahrnutá do regulace buněčné proliferace a buněčné smrti v různých buňkách exprimujících opioidní receptory. Vyšlo najevo, že účinky podporující růst nastávají v nízkých koncentracích nebo v jednotlivých dávkách opioidů a jsou zprostředkovány částečně prostřednictvím Gβγ, která aktivuje PI3K/Akt a Ras/Erk kaskády (Tegeder a Geisslinger 2004).

Bylo také zjištěno, že β -arrestin nepůsobí jen jako adaptorová molekula, ale má také novou funkci jako GPCR signální přenašeč (Tegeder a Geisslinger 2004). Buňky, které neobsahují β -arrestin, podléhají apoptóze. Apoptóza je iniciována prostřednictvím G-proteinů a zahrnuje aktivaci PI3K, MAPK a c-Src, což má za následek uvolnění cytochromu c z mitochondrií a nakonec aktivaci kaspázy-3 a 9 (Revankar 2004).

12.1 Proapoptotické účinky opioidů

Mao a kol. sledovali indukci apoptózy u potkanů, kterým byl podáván morfin, a to v různých dávkách. Zjistili, že apoptotické buňky byly pozorovatelné spíše u potkanů přijímajících vysokou dávku morfinu, než u zvířat dostávajících nižší dávku morfinu. Toto naznačuje, že indukce apoptózy prostřednictvím morfinu je na dávce závislá (Mao 2002). Dlouhodobé vystavení morfinu mělo na intracelulární úrovni za následek upregulaci proapoptotické kaspázy-3 a Bax proteinů, ale downregulaci antiapoptotického proteinu Bcl-2 v zadním rohu spinální míchy (Mao 2002). Dále zjistili, že apoptotické buňky byly umístěny primárně v lamina I-II v zadním rohu prodloužené míchy u potkanů, kterým byl podáván morfin buď opakovaně nebo trvale. Většina buněk, které podléhaly apoptóze v nervové tkáni, patřila mezi neurony, ale některé buňky podstupující apoptózu byly i buňky gliové. Také prokázali, že mnoho apoptotických neuronů jsou GABAergní inhibiční neurony (Mao 2002). Intratekální podání (2x denně) 20 μg morfinu po 7 dní způsobilo upregulaci Bax a kaspázy-3, ale downregulaci Bcl-2 v zadním rohu míšním. Zvýšený počet buněk obsahující rozštěpené kaspázy-3 byl blokován podáním morfinu (20 $\text{nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) a MK-801 (1 $\text{nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$; nekompetitivní NMDAR antagonist), což ukázalo, že NMDARs hrají významnou úlohu ve zvýšení množství kaspázy-3 u potkanů tolerantních k morfinu. MK-801 specificky blokuje proces morfinové tolerance a neuronální apoptózy. Tyto výsledky naznačují, že prodloužená expozice k opioidům, např. morfinu, může vést ke dvěma zdánlivě nepříbuzným jevům, a to k farmakologické toleranci a neuronální excitotoxicitě ve formě apoptotické buněčné smrti (Mao 2002).

Metadon je opioidní agonista původně vyvinutý jako náhrada za heroin. V dnešní době je metadon používán jako analgetikum při léčbě nádorů a také je navržen jako slibná látka pro terapii leukémie (Perez-Alvarez 2011). Perez-Alvarez a kol. se pokoušeli zjistit, jak se podílí AIF na metadonem zprostředkované buněčné smrti. Metadon měl za následek translokaci AIF z mitochondrií do jádra. Translokace byla inhibovaná cyklosporinem A, ale nikoli nedostatkem Bax proteinu. Zdá se, že je to zprostředkováno tvorbou přechodného póru v mitochondriích, nezávisle na Bax proteinu (Perez-Alvarez 2011).

Goswami et al. zjistili, že působení μ - a nebo κ -opioidních agonistů na nervové buňky embryonálního kuřecího mozku zvyšuje jejich náchylnost k smrti apoptotickými mechanismy (Goswami 1998). Boronat a kol. provedli výzkum, ve kterém zjistili, že trvale podávaný morfin způsobuje upregulaci proapoptotického proteinu Bax a downregulaci Bcl-2 v mozku potkanů a je to zprostředkováno prostřednictvím μ -OR (Boronat 2001).

V souvislosti s indukcí apoptózy je důležitá studie ukazující schopnost morfinu zvyšovat expresi mRNA proapoptotického receptoru Fas v myších splenocytech a v lidských lymfocytech (Yin 1999). Významný důsledek apoptózy vyvolané morfinem v lymfocytech je redukce imunitní odpovědi. Bylo zjištěno, že morfin také zvyšuje expresi mRNA proapoptotického Fas receptoru v lymfocytech, slezině, srdci a plicích (Yin 1999).

Opioidy, především morfin a metadon, působící přes specifické receptory, inhibují růst lidských plicních nádorových buněk. Působení 0,1-1 μ M morfinu či metadonu na tyto buňky mělo za následek morfologické změny a štěpení DNA na fragmenty charakteristické pro apoptózu (Maneckjee 1994).

Metadon a morfin – látky, které jsou obecně používány v léčbě nádorové bolesti, jsou silní zprostředkovatelé apoptózy v lidských nádorových plicních buňkách. Zdá se, že jejich apoptotické účinky zahrnují různé signální dráhy (Heusch 1998). Bylo zjištěno, že nikotin blokuje apoptózu indukovanou jak metadonem, tak i morfinem (Heusch 1998).

Lidská děložní sliznice exprimuje specifická κ -opioidní vazebná místa a produkuje hlavní endogenní ligandy – dynorfiny. V experimentech s buněčnými kulturami lidských děložních buněk bylo pozorováno, že syntetický κ -opioidní agonista U69,593 podporuje apoptózu, která je v přítomnosti naloxonu inhibovaná v buňkách děložní sliznice (Chatzaki 2001).

Toll-like receptor 2 (TLR2) je klíčový imunitní receptor z rodiny TLR široce exprimovaný v mnoha systémech (zejména imunitní a nervový systém) a hraje rozhodující roli v kontrole přirozené a adaptivní imunitní odpovědi (Li 2010). Mechanismus, kterým TLR2 zprostředkuje apoptózu v odpovědi na opioidy však není dosud zcela známý. Ukázalo se, že dlouhodobě podávaný morfin výrazně zvyšuje expresi TLR2 mRNA a proteinů v primárních neuronech. Nedostatek TLR2 významně inhibuje apoptózu vyvolanou dlouhodobým podáváním morfinu v primárních neuronech; aktivace kaspázy-3 po léčení morfinem je snížena v primárních neuronech, ve kterých je deficit TLR2. Z těchto výsledků se dá usuzovat na proapoptotickou roli TLR2 při neuronální apoptóze zprostředkované opioidy (Li 2010).

Lim a kol. zjistili, že určité návykové látky, jako je například morfin, mohou indukovat apoptózu v kultivovaných neuronálních buněčných liniích stejně jako v jiných lidských buňkách. Bylo dokázáno, že neuronová apoptóza nastává *in vivo* u potkana v zadním rohu míšním po dlouhodobém podávání morfinu. Apoptóza byla spojena s expresí aktivované kaspázy-3 a zapojením MAPK, což naznačuje, že trvale podávaný morfin může vést ke změnám v CNS. Trvale podávaný morfin zvyšuje aktivitu PKA a AC. Oba tyto enzymy přispívají k mechanismu apoptózy a tudíž je možné, že dlouhodobé podávání morfinu může navodit míšní apoptózu částečně pomocí zvýšení PKA a AC aktivity (Lim 2005).

Protinádorová aktivita morfinu je známá. Sueoka a kol. zjišťovali protinádorovou aktivitu syntetických derivátů morfinu, KT-90 a KT-87. Tyto deriváty morfinu navodily inhibici růstu neuroblastomu a plicních nádorových buněk spojenou se smrštěním buněk, což naznačovalo indukci apoptózy. Tyto výsledky poskytují důkaz protinádorové aktivity morfinových derivátů. Protinádorová aktivita je navozená apoptózou a inhibicí exprese genu TNF- α spojenou s inhibicí aktivace NF- κ B (Sueoka 1998).

Bylo zjištěno, že morfin navozuje apoptózu v lidských vaskulárních endoteliálních buňkách pomocí oxidu dusnatého. Morfinem indukovaná apoptóza je zprostředkována pomocí tvorby NO mechanismem, který snižuje mitochondriální membránový potenciál, stimuluje expresi proapoptotických faktorů Bak a Bax a aktivuje kaspázy 3 a 7 (Hsiao 2009).

Některé studie odhalily možnost, že trvalé podávání opioidních látek může zasahovat do učení a paměti prostřednictvím neurotoxických účinků souvisejících s aktivací apoptotického mechanismu. Byly vyhodnoceny účinky prodlouženého podávání heroínu na senzomotorické a kognitivní funkce u myší, a také změny exprese proteinů regulujících vnější a mitochondriální apoptotickou cestu (Tramullas 2008). Výsledky ukázaly, že 6-12 hodin po podkožní injekci heroínu se zvýšila exprese Bad v mozkové kůře a FasL v hippokampu. Trvalé podávání heroínu, dvakrát denně po 34 dní, mělo za následek upregulaci Fas, FasL a Bad v mozkové kůře a hippokampu. Tyto změny pozorované u proteinů souvisejících s apoptózou silně naznačují, že podávání heroínu bylo spojeno s apoptózou. Bylo tedy zjištěno, že trvalé podávání heroínu omezuje kognitivní schopnosti myší a je to spojeno s upregulací proapoptotických proteinů (Tramullas 2008).

Olin a kol. zkoumali, zda morfin zvyšuje aktivitu kaspáz *in vivo*. Z pokusů na myších přišli k názoru, že podání samotného morfinu významně nezvýší aktivitu kaspáz. Ale podání morfinu společně s LPS (lypopolysacharid) navodí významné zvýšení aktivity kaspáz v různých tkáních (slezina, thymus, játra). Také zjistili, že morfin reguluje aktivaci kaspáz prostřednictvím vazby na μ -OR (Olin 2010). Emeterio a kol. se také zabývali účinky morfinu

na apoptózu. Došli k závěru, že jak trvalá vysoká dávka morfinu, tak abstinenci příznaky navozují apoptotickou buněčnou smrt ovlivňující neurony i gliové buňky v mozku myši. Byla pozorovaná zvýšená aktivita kaspázy 3 a 8 a upregulace proapoptotických proteinů FasL, Fas a Bad a downregulace antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Emeterio 2006).

Závislost na heroinu a dalších drogách představuje vážný celosvětový problém a velké riziko hlavně pro těhotné ženy a jejich děti. Trvalé působení opioidních látek v CNS (např. heroinu) může teratogenně působit na nervový systém prostřednictvím aktivace apoptotické cesty, zvýšením exprese proapoptotických faktorů v mozku (Ying 2009).

12.2 Antiapoptotické účinky opioidů

Hromadící se fakta ukazují, že morfin může vykazovat také antiapoptotickou aktivitu. Lin a kol. se zabývali hypotézou, že morfin může zvrátit proapoptotickou aktivitu DOX (doxorubicin), což je běžně používaná protinádorová látka pro léčbu neuroblastomu. Morfin inhibuje tvorbu ROS a brání doxorubicinem zprostředkované aktivaci kaspázy-3, uvolnění cytochromu c a změnám exprese proteinů Bax a Bcl-2. Morfin blokuje aktivaci transkripce NF- κ B, který je esenciální pro proapoptotickou roli DOX (Lin 2007).

Morfin a heroin mohou spouštět apoptózu a porušovat funkce imunitního systému. Opičí SIV virus napadá lymfocyty, ale po podání morfinu bylo zjištěno, že morfin ochraňuje buňky před apoptózou a dovoluje viru pokračovat v replikaci (Chuang 1993). Tato studie, ve které byly zjištěny patrně protichůdné účinky opiátů na apoptózu, byla dále rozpracována. Byly použity lidské lymfocyty, které v přítomnosti aktinomycinu D podléhaly apoptóze. Apoptóza byla doprovázena expresí aktivní formy p53. Po podání morfinu se snížila exprese Bax a zvýšila exprese Bcl-2. Morfin tedy pomocí vazby na opioidní receptor ochránil lymfocyty od apoptózy (Suzuki 2003).

Nejnovější výzkumy ukázaly, že buněčná smrt během ischemie je převážně nekrotického charakteru, zatímco poškození reperfuzí je zprostředkováno apoptózou. Opioidy blokují apoptózu kardiomyocytů aktivací δ -OR v srdci králíka. V srdci potkanů převládá κ -OR a tak bylo zjišťováno, zda stimulace κ -OR navozuje kardioprotekční účinky. Byl použit κ -opioidní agonista U50,488H, který způsoboval signifikantní pokles fragmentace DNA, snižoval aktivaci kaspázy 3 a 9, měnil poměr Bcl-2/Bax proteinů a snižoval počet infarktů. Výsledky ukazují antiapoptotické účinky U50,488H, které jsou zprostředkovány κ -OR v srdci potkana a poskytují první důkaz, že U50,488H snižuje apoptózu kardiomyocytů prostřednictvím aktivace κ -OR. Toto zjištění je důležité pro klinické použití κ -agonistů v

zabránění buněčné smrti během I/R (ischemia/reperfusion) poškození a srdečního selhání (Fan 2009).

Survivin je malý protein propojující buněčnou smrt a přežití a může hrát roli v apoptóze kardiomyocytů. Survivin je esenciální pro buněčné dělení a je známo, že inhibuje apoptózu během embryonálního vývoje a u dospělých v rakovinných tkáních. Yao a kol. pozorovali, že u kardiomyocytů kultivovaných v nedostatku glukózy a séra byl pozitivní vztah mezi množstvím survivinu, Bcl-2 a ERK (extracellular signal-regulated kinase) a antiapoptotickým působením δ -opioidního receptorového agonisty DADLE. Tento vztah poskytuje první důkaz antiapoptotického účinku survivinu, který stimuluje δ -opioidní receptory v kardiomyocytech. Regulátory survivinu jsou ERK a PI3K (Yao 2007).

13. Závěr

Apoptóza je důležitý mechanismus zahrnutý nejen při odstraňování infikovaných nebo umírajících buněk, ale také v embryogenezi. Bez programované buněčné smrti by například nebyl správně dokončen vývoj nervové tkáně. Více než polovina neuronů nedostane signály od růstových faktorů a podstupuje apoptotický proces, na jehož konci je smrt. Kromě neuronů jsou k programované buněčné smrti určeny buňky mezi prsty při vývoji plodu v děloze. Tento proces je také významný při transplantacích a nádorových onemocněních. Léky na bázi opioidů se používají ke snížení bolesti při různých patologických stavech. Je však stále potřeba pokračovat ve vývoji analgetik, která nebudou způsobovat nežádoucí vedlejší účinky, jako je tolerance či návykovost.

Bylo zjištěno, že opioidy mohou mít vliv na proces buněčné smrti. Byly popsány proapoptotické, ale i antiapoptotické účinky těchto látek. Zejména morfin vykazuje oba tyto typy účinků. Zdá se, že působením morfinu na buněčné kultury dochází k nárůstu proteinů Bax, k aktivaci kaspáz a obecně k iniciaci mechanismů vedoucích k apoptóze. Na druhou stranu, když je morfin přidán k buňkám, které podléhají apoptóze, může působit antiapoptoticky a snižovat množství Bax proteinů a aktivovaných kaspáz. Zdá se, že tedy záleží na tom, zda se morfin přidá k buňkám, které apoptóze již podléhají. V tomto případě působí antiapoptoticky. Když je však přidán například k buňkám nádorovým, vykazuje proapoptotické účinky.

U další klinicky významné látky, metadonu, který má analgetické účinky, bylo zjištěno, že při léčení nádorů vykazuje proapoptotické účinky.

Často se také sledují účinky zneužívaného opioidu heroinu na vývoj plodu u těhotných žen závislých právě na tomto syntetickém opioidu. Je zřejmé, že ženy užívající heroin vystavují své děti nejen pomalejšímu růstu během těhotenství, snížené porodní hmotnosti, ale i jiným zdravotním problémům zahrnujícím problémy s dýcháním či možnost vzniku anorexie v dospělosti. Také nejsou výjimkou předčasné porody nebo dokonce narození mrtvých dětí.

Další výzkum v této oblasti je nezbytný pro vyvinutí silných a účinných analgetik bez vedlejších účinků a také při boji proti onemocněním, jako je například rakovina.

14. Literatura

- Boronat, M. A., Garcia-Fuster, M. J. & Garcia-Sevilla, J. A. 2001. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *British Journal of Pharmacology*, **134**, 1263-1270.
- Bouillet, P. & Strasser, A. 2002. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *Journal of Cell Science*, **115**, 1567-1574.
- Chatzaki, E., Makrigiannakis, A., Margioris, A. N., Kouimtzioglou, E. & Gravanis, A. 2001. The Fas/FasL apoptotic pathway is involved in kappa-opioid-induced apoptosis of human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction*, **7**, 867-874.
- Chen, G. Q. & Goeddel, D. V. 2002. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway. *Science*, **296**, 1634-1635.
- Chuang, L. F., Killam, K. F. & Chuang, R. Y. 1993. Increased replication of simian immunodeficiency virus in cem x174 cells by morphine-sulfate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **195**, 1165-1173.
- Connor, M. & Christie, M. J. 1999. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **26**, 493-499.
- Darlison, M. G., Greten, F. R., Harvey, R. J., Kreienkamp, H. J., Stuhmer, T., Zwiers, H., Lederis, K. & Richter, D. 1997. Opioid receptors from a lower vertebrate (*Catostomus commersoni*): Sequence, pharmacology, coupling to a G-protein-gated inward-rectifying potassium channel (GIRK1), and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 8214-8219.
- Dreborg, S., Sundstrom, G., Larsson, T. A. & Larhammar, D. 2008. Evolution of vertebrate opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15487-15492.
- Duarte, D. F. 2005. Opium and Opioids: A Brief History. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **55**, 135-146.
- Emeterio, E. P. S., Tramullas, M. & Hurle, M. A. 2006. Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. *Journal of Neuroscience Research*, **83**, 1352-1361.
- Fan, R., Zhang, P., Ye, M. X., Zhang, Q. Y., Yin, Z., Zhang, S. M., Guo, H. T., Bi, H., Wang, Y. M., Cheng, L., Gu, C. H., Chen, T., Cui, Q., Yu, S. Q., Yi, D. H. & Pei, J. M. 2009. Myocardial Apoptosis and Infarction after Ischemia/Reperfusion Are Attenuated by kappa-Opioid Receptor Agonist. *Archives of Medical Research*, **40**, 227-234.
- Goldstein, J. C., Munoz-Pinedo, C., Ricci, J. E., Adams, S. R., Kelekar, A., Schuler, M., Tsien, R. Y. & Green, D. R. 2005. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **12**, 453-462.
- Goswami, R., Dawson, S. A. & Dawson, G. 1998. Cyclic AMP protects against staurosporine and wortmannin-induced apoptosis and opioid-enhanced apoptosis in both embryonic and immortalized (F-11 kappa 7) neurons. *Journal of Neurochemistry*, **70**, 1376-1382.
- Grevel, J. & Sadee, W. 1983. An opiate binding-site in the rat-brain is highly selective for 4,5-epoxymorphinans. *Science*, **221**, 1198-1201.
- Hengartner, M. O. & Horvitz, H. R. 1994. C-elegans cell-survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2. *Cell*, **76**, 665-676.
- Heusch, W. L. & Maneckjee, R. 1998. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis human lung cancer cells. *Carcinogenesis*, **19**, 551-556.
- Hsiao, P. N., Chang, M. C., Cheng, W. F., Chen, C. A., Lin, H. W., Hsieh, C. Y. & Sun, W. Z. 2009. Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. *Toxicology*, **256**, 83-91.

- Jacobson, M. D., Weil, M. & Raff, M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, **88**, 347-354.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. 1972. Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, **26**, 239-&.
- Kurose, H. 2003. G alpha(12) and G alpha(13) as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sciences*, **74**, 155-161.
- Li, Y., Li, H., Zhang, Y., Sun, X. L., Hanley, G. A., LeSage, G., Sun, S. G., Peng, Y. & Yin, D. L. 2010. Toll-like receptor 2 is required for opioids-induced neuronal apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **391**, 426-430.
- Lim, G. W., Wang, S. X., Limb, J. A. & Mao, J. R. 2005. Activity of adenylyl cyclase and protein kinase A contributes to morphine-induced spinal apoptosis. *Neuroscience Letters*, **389**, 104-108.
- Lin, X., Li, Q., Wang, Y. J., Ju, Y. W., Chi, Z. Q., Wang, M. W. & Liu, J. G. 2007. Morphine inhibits doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and nuclear factor kappa B transcriptional activation in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochemical Journal*, **406**, 215-221.
- Maneckjee, R. & Minna, J. D. 1994. Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung-cancer cells. *Cell Growth & Differentiation*, **5**, 1033-1040.
- Mansour, A., Fox, Ch. A., Akil, H. & Watson, S. J. 1995. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in Neurosciences*, **18**, 22-29.
- Mao, J. R., Sung, B. K., Ji, R. R. & Lim, G. 2002. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: Evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *Journal of Neuroscience*, **22**, 7650-7661.
- Ndozangue-Tourigui, O., Hamelin, J. & Breard, J. 2008. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, **76**, 11-18.
- Neves, S. R., Ram, P. T. & Iyengar, R. 2002. G protein pathways. *Science*, **296**, 1636-1639.
- Olin, M. R., Roy, S. & Molitor, T. 2010. In Vivo Morphine Treatment Synergistically Increases LPS-Induced Caspase Activity in Immune Organs. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **5**, 546-552.
- Perez-Alvarez, S., Iglesias-Guimaraes, V., Solesio, M. E., de Mera, R., Yuste, V. J., Galindo, M. F. & Jordan, J. 2011. Methadone induces CAD degradation and AIF-mediated necrotic-like cell death in neuroblastoma cells. *Pharmacological Research*, **63**, 352-360.
- Raff, M. C. 1992. Social controls on cell-survival and cell-death. *Nature*, **356**, 397-400.
- Revankar, C. M., Vines, C. M., Cimino, D. F. & Prossnitz, E. R. 2004. Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 24578-24584.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M. & Venkatachalam, M. A. 1999. Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease. *American Journal of Medicine*, **107**, 489-506.
- Satoh, M. & Minami, M. 1995. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, **68**, 343-364.
- Savill, J., Gregory, C. & Haslett, C. 2003. Eat me or die. *Science*, **302**, 1516-1517.
- Standifer, K. M. & Pasternak, G. W. 1997. G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cellular Signalling*, **9**, 237-248.
- Sueoka, E., Sueoka, N., Kai, Y., Okabe, S., Suganuma, M., Kanematsu, K., Yamamoto, T. & Fujiki, H. 1998. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF-kappa B activation. *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications*, **252**, 566-570.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C. & Kroemer, G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, **192**, 571-579.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. & Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.
- Suzuki, S., Chuang, L. F., Doi, R. H. & Chuang, R. Y. 2003. Morphine suppresses lymphocyte apoptosis by blocking p53-mediated death signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **308**, 802-808.
- Tegeder, I. & Geisslinger, G. 2004. Opioids as modulators of cell death and survival - Unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacological Reviews*, **56**, 351-369.
- Tramullas, M., Martinez-Cue, C. & Hurle, M. A. 2008. Chronic administration of heroin to mice produces up-regulation of brain apoptosis-related proteins and impairs spatial learning and memory. *Neuropharmacology*, **54**, 640-652.
- Tseng, L. F. 2001. Evidence for epsilon-opioid receptor-mediated beta-endorphin-induced analgesia. *Trends in Pharmacological Sciences*, **22**, 623-630.
- Vaux, D. L., Cory, S. & Adams, J. M. 1988. Bcl-2 gene promotes hematopoietic-cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-b-cells. *Nature*, **335**, 440-442.
- Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science*, **296**, 1635-1636.
- Yang, J., Liu, X. S., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J. Y., Peng, T. I., Jones, D. P. & Wang, X. D. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
- Yao, L. L., Wang, Y. G., Cai, W. J., Yao, T. & Zhu, Y. C. 2007. Survivin mediates the anti-apoptotic effect of delta-opioid receptor stimulation in cardiomyocytes. *Journal of Cell Science*, **120**, 895-907.
- Yin, D. L., Mufson, R. A., Wang, R. & Shi, Y. F. 1999. Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature*, **397**, 218-218.
- Ying, W., Jang, F. F., Teng, C. & Tai-Zhen, H. 2009. Apoptosis may involve in prenatally heroin exposed neurobehavioral teratogenicity? *Medical Hypotheses*, **73**, 976-977.
- Yuan, J. Y., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. 1993. The c-elegans cell-death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell*, **75**, 641-652.
- Zagon, I. S., Goodman, S. R. & McLaughlin, P. J. 1989. Characterization of zeta (zeta - a new opioid receptor involved in growth. *Brain Research*, **482**, 297-305.
- Zagon, I. S., Goodman, S. R. & McLaughlin, P. J. 1993. Zeta (zeta), the opioid growth-factor receptor - identification and characterization of binding subunits. *Brain Research*, **605**, 50-56.
- Zimmermann, K. C. & Green, D. R. 2001. How cells die: Apoptosis pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **108**, S99-S103.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X. S., Lutschg, A. & Wang, X. D. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to C-elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-413.

15. Internetové zdroje

- [1] <http://en.wikipedia.org/wiki/Opioid>
- [2] <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/mat/farma/vk/airio/fig21.gif>
- [3] <http://en.wikipedia.org/wiki/Agonist>
- [4] http://en.wikipedia.org/wiki/Receptor_antagonist
- [5]

http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://195.250.138.169/fyziologie/Fyziologie%25204_06/img/web_Fyziologie_4_06_img_13.jpg&imgrefurl=http://195.250.138.169/fyziologie/Fyziologie%25204_06/web_Fyziologie_4_06.htm&usq=rmYtqTfjewm2h6gPvZUMFluPII=&h=346&w=507&sz=23&hl=cs&start=5&zoom=1&tbnid=H_HAP9ZKWHJQ9M:&tbnh=89&tbnw=131&ei=3Wm9Tf73KMiUswaup2HBg&prev=/search%3Fq%3Daktivace%2BG-protein%25C5%25AF%26um%3D1%26hl%3Dcs%26sa%3DN%26biw%3D1009%26bih%3D574%26tbn%3Disch&um=1&itbs=1